

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 11-021285

(43)Date of publication of application : 26.01.1999

(51)Int.Cl.

C07D321/00
 C07F 9/655
 C07F 9/6574
 C09K 11/06
 C12Q 1/42
 C12Q 1/68
 G01N 33/533

(21)Application number : 08-086324

(71)Applicant : TROPIX INC

(22)Date of filing : 09.04.1996

(72)Inventor : BRONSTEIN IRENA
 EDWARDS BROOKS
 JUO ROUH-RONG

(30)Priority

Priority number : 90 574786

Priority date : 30.08.1990

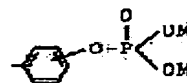
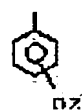
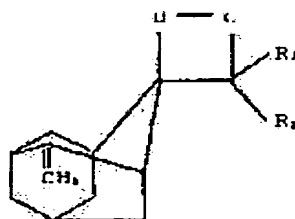
Priority country : US

(54) CHEMILUMINESCENT 1,2-DIOXETANE COMPOUND

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain a new compound cleavable by an enzyme, and short in time necessary for completing the assay when used as a reporter molecule in an assay, in particular, biological assay.

SOLUTION: This new compound is shown by formula I [R1 is O(CH₂)_nCH₃ ((n) is 0-19), pref. methoxy; R2 is a group of formula II or formula III (Z is a residue selected from phosphate, galactoside, acetate, 1-phospho-2,3-diacylglyceride, adenosine triphosphate, etc.), pref. of formula IV (M is an alkali metal or ammonium)], e.g. diethyl 1-methoxy-1-(3-pivaloyloxyphenyl) methanephosphate. The compound of formula I is obtained, for example, by using a compound of the formula HC(=O)-φ-OR₉ (R₉ is a lower alkyl, etc.), as the starting material and in accordance with the process described in the USP #279,176 by Edwards, et. al (Sept. 6, 1989).



LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 09.04.1996

[Date of sending the examiner's decision of rejection] 06.07.1999

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or

application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision 11-15924
of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's 04.10.1999
decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平11-21285

(43) 公開日 平成11年(1999) 1月26日

(51) Int.Cl.⁶

識別記号

F I

C 0 7 D 321/00

C 0 7 D 321/00

C 0 7 F 9/655

C 0 7 F 9/655

9/6574

9/6574

C 0 9 K 11/06

C 0 9 K 11/06

C 1 2 Q 1/42

C 1 2 Q 1/42

審査請求 有 請求項の数 2 O L (全 12 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号

特願平8-86324

(62) 分割の表示

特願平3-518245の分割

(22) 出願日

平成3年(1991) 8月30日

(31) 優先権主張番号

5 7 4 7 8 6

(32) 優先日

1990年 8月30日

(33) 優先権主張国

米国 (U S)

(71) 出願人 592250285

トロピックス・インコーポレーテッド

T R O P I X, I N C.

アメリカ合衆国マサチューセッツ州01730,

ベッドフォード, ウィギンズ・アベニュー

47

(72) 発明者 ブロンスタイン, イレーナ

アメリカ合衆国マサチューセッツ州02158,

ニュートン, アイバンホー・ストリート

11

(74) 代理人 弁理士 津国 肇 (外2名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 化学発光性 1, 2-ジオキセタン化合物

(57) 【要約】

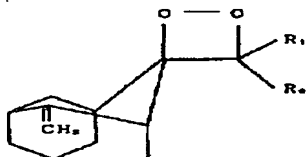
【課題】 各種検定方法のレポーター分子として有用で

ある、酵素によって開裂可能な、改良された化学発光性

1, 2-ジオキセタン化合物を提供する。

【解決手段】 式:

【化14】



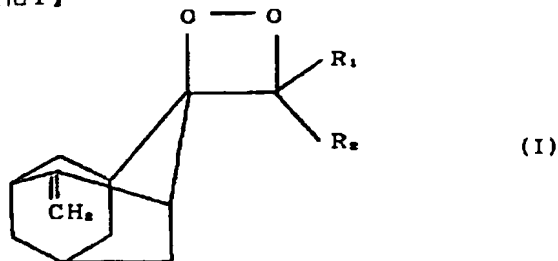
(I)

〔式中、R₁ は、-O (CH₂)_n CH₃ (n=0~1
9) であり、R₂ は、-OZ (Zは、ホスフェート、ガ
ラクトシドなどである) で置換されたフェニルまたはナ
フチルである〕で示される 1, 2-ジオキセタン化合
物。

【特許請求の範囲】

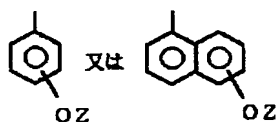
【請求項 1】 式 (I) :

【化 1】



【式中、 R_1 は、 $-O(CH_2)_nCH_3$ であって、 n は 0 ~ 19 の整数であり； R_2 は、次式：

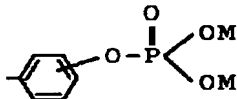
【化 2】



(式中、 Z は、ホスフェート、ガラクトシド、アセテート、1-ホスホ-2, 3-ジアシルグリセリド、1-チオ-D-グルコシド、アデノシントリホスフェート、アデノシンジホスフェート、アデノシンモノホスフェート、アデノシン、 α -D-グルコシド、 β -D-グルコシド、 α -D-マンノシド、 β -D-マンノシド、 β -D-フルクトフラノシド、 β -D-グルコシドウロネート、p-トルエンスルホンルー-L-アルギニンエステル及びp-トルエンスルホンルー-L-アルギニンアミドからなる群から選択される残基である) で示される] で表される、酵素によって開裂可能な不安定な置換基が分子に結合しており、該結合を意図的に開裂する前は室温で実質的に安定で、分解時に光エネルギーを生じうる、酵素によって開裂可能な化学発光性 1, 2-ジオキセタン化合物。

【請求項 2】 R_1 がメトキシ基であり、 R_2 が

【化 3】



(M はアルカリ金属又はアンモニウム基を表す) である請求項 1 記載の 1, 2-ジオキセタン化合物。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、改良された化学発光性の 1, 2-ジオキセタン化合物に関する。さらに詳しくは、本発明は、酵素によって除去可能な不安定基を有する、改良された、酵素によって開裂可能な化学発光性 1, 2-ジオキセタン化合物に関する。そのような不安定基は、適当な酵素を添加して不安定基を除くまで、分子が分解して適当な器具によって検知しうる光を生じ

るのを防ぐ。

【0002】 1つの酵素分子は、触媒作用によってその対応する不安定基を、酵素によって開裂可能な化学発光性 1, 2-ジオキセタン分子から除去する。これは、対応する不安定基を各ジオキセタン分子から除くのに化学開裂剤 1 分子を必要とする化学的に開裂可能な化学発光性 1, 2-ジオキセタンの場合とは、著しく対照的である。例えば、3-(2'-スピアアダマンタン)-4-メトキシ-4-(3'-ヒドロキシ)フェニル-1, 2-ジオキセタンのフェニル基上のヒドロキシ置換基から 1 モルの水素イオンを開裂するのに、水酸化ナトリウムが 1 モル必要であり、一方、1 秒当たり 1, 000 ~ 5, 000 モルの 3-(2'-スピアアダマンタン)-4-メトキシ-4-(3'-ホスホリルオキシ)フェニル-1, 2-ジオキセタン二ナトリウム塩のホスホリルオキシ基を開裂するのに、わずか 1 モルのアルカリホスファターゼ (AP) が必要なだけである；ジャブロンスキー (Jablonski) の「伝染病の場合の DNA プローブ (DNA Probes for Infectious Diseases)」(Boca Raton, Fla. : CRC Press, 1989, p22) 参照。

【0003】 酵素によって開裂可能な、光を生じる 1, 2-ジオキセタン化合物は、通常、安定化基、例えばジオキセタン環の 3-炭素原子にスピロ結合したアダマンチリデン基を有し、これは、酵素によって開裂可能な不安定基が、分子の残分に結合している結合を意図的に開裂する前は、ジオキセタン化合物が室温 (約 25℃) で実質的に分解するのを妨げる手助けをしている。安定化のためにスピロアダマンチル基を用いる考え方は、ウィーリング (Wierynga) 等の *Tetrahedron Letters*, 169 (1972) 及びマキャプラ (McCapra) 等の *J. Chem. Comm. Soc. Chem. Comm.*, 944 (1977) によって 1, 2-ジオキセタン化学に導入された。したがって、これらの安定化基は、そのようなジオキセタンが実質的な分解を生じることなく、約 4 ないし約 30℃ の温度で、使用前の許容される長期間、例えば約 12 カ月ないし約 12 年間もの間、の貯蔵を可能にする。

【0004】 本発明はさらに、ジオキセタン分子を、当業界で知られている免疫学的アッセイ、化学的アッセイ及び核酸プローブアッセイに用いることに関し、そして様々な高分子、合成重合体、タンパク質、核酸、触媒性抗体等の分子構造及び顕微鏡組織の研究にこれらを直接的な化学的/物理的プローブとして用いて、アナライトの存在、量又は構造を測定する化学又は生物物質の確認又は定量を可能にすることに関する。

【0005】

【従来の技術】 近年、特にブロンスタイン (Bronstein) の 1986 年 7 月 24 日付け米国特許出願第 889, 823 号；ブロンスタイン等の 1987 年 12 月 31 日付け米国特許出願第 140, 035 号；エドワーズ (Edwards) の特開平 2-724 号及びエドワーズ等の 1988

年6月30日付け米国特許出願第213, 672号に記載の、酵素によって開裂可能な化学発光性1, 2-ジオキセタンが出現してから、化学発光性1, 2-ジオキセタンはますます重要な化合物になってきた。

【0006】酵素によって開裂可能な1, 2-ジオキセタンとは著しく対照的に、これまでの公知の様々な化学的に開裂しうる1, 2-ジオキセタンは、何かの分析法のリポーター分子としての用途があったとしても、それはほんの少しであり、バイオアッセイでは用いられていなかったのは確かである。その理由は、公知の化学的に開裂しうる化合物は、大部分が水不溶性-水及び有機溶媒にいくらか可溶性である特定のアセトキシ-置換1, 2-ジオキセタン以外であり、したがって、抗体のような生物成分と結合できる基又は置換基をこれらに付加することによって変性して、そのような化学的に結合した開裂可能な1, 2-ジオキセタンを化学的に活性化した化学発光性標識として用いることができるようにしなければ、生物学的アッセイには有用ではないからである。

【0007】適当な酵素の存在下、発光を伴って分解する、酵素によって開裂可能な代表的な化学発光性1, 2-ジオキセタン-例えば、アダマンチルを付加した酵素によって開裂可能な1, 2-ジオキセタン、例えば3-(4-メトキシスピロ[1, 2-ジオキセタン-3, 2'-トリシクロ[3.3.1.1^{3,7}]デカン]-4-イル)フェニルホスフェート及びその塩(例えばナトリウム塩)は、水溶性であるので、水性媒体中で行われる各種の分析法、特に生物学的アッセイにおけるリポーターとして用いるのに大変適している。これらの化合物は以後、次のように略記する：アダマンチリデン-メトキシフェノキシホスホリル化ジオキセタン(AMPPD)、並びに3-(4-メトキシスピロ[1, 2-ジオキセタン-3, 2'-トリシクロ[3.3.1.1^{3,7}]デカン]-4-イル)フェニルオキシ-3"-β-D-ガラクトピラノシド及びその塩(AMPGD)。

【0008】AMPPDは、水溶液中、及び/又は化学発光促進剤、例えばポリ[ビニルベンジル(ベンジルジメチルアンモニウムクロリド)](BDMQ)及び他のヘテロ極性重合体[ボイタ(Voyta)等の1988年6月1日付け米国特許出願第203, 263号参照]のような重合体の四級アンモニウム、ホスホニウム又はスルホニウム塩の存在下で、一定の発光特性に達した最適時間がより長いことが観察された(「 $t_{1/2}$ 」は、一定の定常状態の発光レベルにおける最高化学発光強度の1/2に達するのに要する時間と定義する；この発光半減期は、様々な環境におけるジオキセタンオキシアニオンの安定性によって変わる)。

【0009】統計学的には、定常状態の発光特性に達するのに、約7 $t_{1/2}$ の時間が必要である。BDMQの存在下、pH9.5の水溶液中、 $2 \times 10^{-5} M$ を越える濃度のAMPPDの $t_{1/2}$ は7.5分であることが分かった。BDMQの不存在下、 $4 \times 10^{-3} M$ では、 $t_{1/2}$ は約30~60分であり、一方、水溶液中、 $2 \times 10^{-5} M$ で、AMPPDの $t_{1/2}$ は2.5分であることが分かった。

【0010】酵素によって開裂可能な化学発光性1, 2-ジオキセタンをリポーター分子として用いる急速生物学的アッセイでは、アッセイにおけるエンドポイントを検出するためにできるだけ速く定常状態の発光特性に達するのが好ましい。また、化学発光強度は定常状態に達する前に測定することができるが、定常状態の発光特性の前に正確なデータを得ることを望むのならば、最新の熱制御発光測定装置を使用しなければならない。

【0011】さらに、BDMQは、化学発光促進剤の存在下及び不存在下の、緩衝剤を加えた水溶液中で、より強い熱的な及び他のものによる非酵素活性化発光、すなわちノイズ発光を示す。そのようなノイズは、アダマンタノンの励起状態からの発光、及びAMPPD分子の芳香族部分から誘導されたメチル-m-オキシベンゾエートアニオンの発光によるものである。AMPPDの測定ノイズレベルは、標準ルミノメーターにおける暗流より約2桁大きいので、このノイズは検出レベルを制限し、したがって最終的な感度を表すことを妨げる。

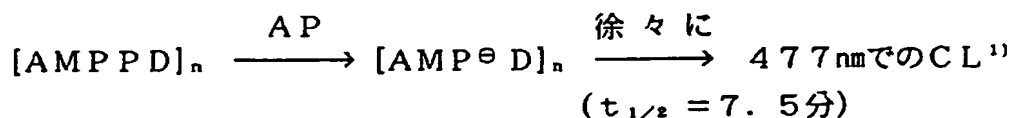
【0012】アルカリホスファターゼを用いたAMPPDの酵素による開裂を行うと、アニオン性脱リン酸化AMPPD-アダマンチリデン-メトキシメチルフェノレートジオキセタン、すなわちAMP-D-も生じる。このフェノレートアニオンはまた、加水分解によって少量形成されることもあり、バックグラウンド化学発光シグナルを引き起こす。これは、組織化された分子集合体、例えばミセル、リポソーム、層板状層、薄膜、脂質二重層、リポソーム小胞、逆ミセル、マイクロエマルジョン、ミクロゲル、ラテックス、膜又は重合体表面において、及びBDMQのような化学発光促進剤によって生じた疎水性環境において、強力な増強されたレベルの発光を生じ、このため、高いバックグラウンドシグナルが生じ、AMPPDの酵素による加水分解から生じるシグナルの動的範囲をかなり低下させることになる。

【0013】上記の観察に基づき、我々は以下のメカニズムを仮定した。BDMQのような促進重合体の存在下では：

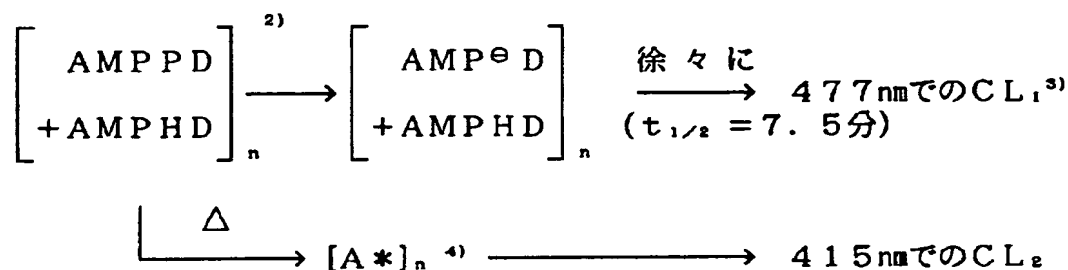
【0014】

【化4】

1. 酵素による経路 (AP 存在) :



2. 熱による経路 (AP 不存在) :



【0015】1) 「CL」は化学発光を表す。

2) AMPPDの緩衝剤を加えた水溶液には、脱リン酸化及び加水分解を行った1, 2-ジオキセタン (AMPHD) が少量含まれる。溶液のpHが十分に高い(約9.5より上)と、脱リン酸化ジオキセタンはAMP⁻Dとしてアニオン状態で存在しうる。

3) 「CL₁」及び「CL₂」はバックグラウンド化学

発光を表す。

4) 「A*」は励起エネルギー状態のアダマンタノンを表す。

【0016】促進重合体の不存在下でも、AMPPDは凝集体として水溶液中に存在する：

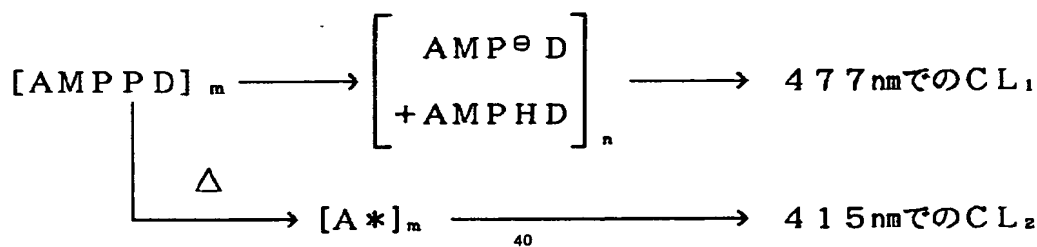
【0017】

【化5】

3. 酵素による経路 :



4. 熱及び加水分解による経路 :



【0018】上記のメカニズムでは、 $n \gg m$ である； n 及び m は促進重合体の存在下又は不存在下及びAMPPD濃度によって変わる。

【0019】凝集体の形のアダマンタノン一重項の励起状態 (n 又は $m > 1$) は、凝集していないアダマンタノンの励起エネルギー状態よりも、シグナルをより多く発し、またここでは特に、BDMQのような化学発光促進剤を存在させることによって安定化しても、より多くの光を放出する。これはおそらく、前者の一重項状態が後

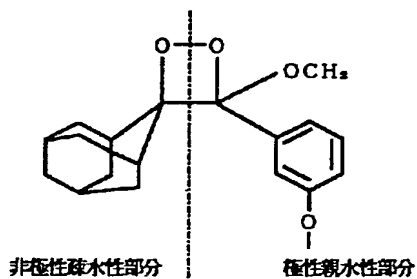
者より低いため、項間交差の生じるのがより少ないか、又は項間交差の速度がより遅いためであるか、あるいはまだ知られていない他のファクターによるためであろう。ルミノメーターは、一般にこれらのエネルギーすなわちこれらの波長に関係なく、放出される全ての光子を検出するように設計されているので、415nm及び477nmの化学発光は共にバックグラウンドノイズ発光として検出される。同様に、写真又はX線フィルムを用いて化学発光を記録するとき、異なる波長の発光間の識別は

容易に行うことができず、したがって検出感度はバックグラウンドノイズによって制限される。

【0020】最後に、上記の条件下で観察される AMP PD の凝集は、AMP PD 又はそのフェノレートアニオン及び以下のような分子：

【0021】

【化6】



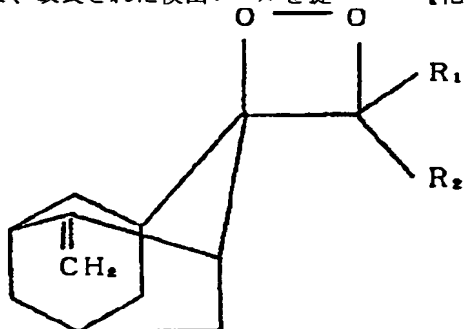
【0022】の両親媒性の性質による。

【0023】

【発明が解決しようとする課題】したがって、本発明の目的は、分析、特に酵素によって開裂可能な化学発光性の 1, 2-ジオキセタンをレポーター分子として用いる生物学的アッセイに要する時間を減少させることである。

【0024】また、本発明の目的は、アッセイ、特に生物学的アッセイにおけるレポーター分子として用いたとき、検定を完了するのに要する時間が少ない、新規で改良された酵素によって開裂可能な化学発光性の 1, 2-ジオキセタンを提供することである。

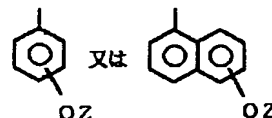
【0025】別の本発明の目的は、酵素に基づいたアッセイ、特に生物学的アッセイの基質として用いる、新規で改良された、酵素によって開裂可能な化学発光性の 1, 2-ジオキセタンを提供することであり、この化合物は、バックグラウンドに対して改良されたシグナルを提供し、そしてしたがって、改良された検出レベルを提



【0032】〔式中、 R_1 は、 $-O(CH_2)_nCH_3$ であって、 n は 0~19 の整数であり； R_2 は、次式：

【0033】

【化8】



供する。

【0026】本発明のこれらのそして他の目的並びに性質、範囲及び用途は、以下の記載及び請求の範囲から、当業者には容易に明らかになるであろう。

【0027】

【課題を解決するための手段】本発明は、水性媒体中、例えば溶液に生物液を加えた試料中で、又は固体表面上、例えばナイロン膜のような膜表面上で、酵素、又は特定の結合対で変性した酵素と反応させて、光学的に検出するエネルギーを放出することができる、新しい種類の安定で、酵素によって開裂可能な化学発光性の 3-(置換アダマンチリデン)ジオキセタン化合物を提供するものである。

【0028】水性媒体中で、これらの変性アダマンチリデンジオキセタンを用いて分析を行うことができ、分析ではこれらの化合物はリポーター分子として用いられ、AMP PD を用いてこれまで行ってきた分析よりも速くかつよりすぐれた感度で行うことができる。

【0029】我々はいかなるメカニズム又は理論と結び付けて、この予想外に優れた効果を説明することは望まないが、アダマンチリデン部分上又はその中の上記種類の置換基の存在が、ジオキセタン分子が効率的に働くのを妨げ、したがってこれらがミセル状の又は他の凝集状態の安定化した組織化集合体が形成されるのを妨げるのかもしれない。これらの置換基のあるものはまた、水自体を含めた水性環境中で、他の物質に水素結合し、これによってさらに凝集体が形成されるのを妨げている。また、 $t_{1/2}$ がより短くなったり、バックグラウンドノイズがより小さくなることから分かるように、電子的及び双極子効果がこの現象に寄与している可能性もある。

【0030】本発明の新規な化学発光性 1, 2-ジオキセタン化合物は一般式 (I)：

【0031】

【化7】

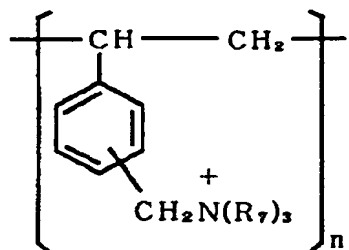
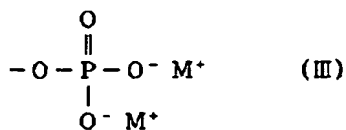
【0034】(式中、Z は、ホスフェート、ガラクトシド、アセテート、1-ホスホ-2, 3-ジアシルグリセ

リド、1-チオ-D-グルコシド、アデノシントリホスフェート、アデノシンジホスフェート、アデノシンモノホスフェート、アデノシン、 α -D-グルコシド、 β -D-グルコシド、 α -D-マンノシド、 β -D-マンノシド、 β -D-フルクトフラノシド、 β -D-グルコシドウロネート、p-トルエンスルホニル-L-アルギニンエステル及びp-トルエンスルホニル-L-アルギニンアミドからなる群から選択される残基である)で示される]で表すことができる。

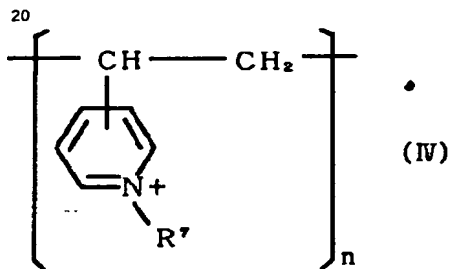
【0035】 R_1 は特にメトキシ基であるのが好ましい。 R_2 は、光を放出するいくつかの発蛍光団形成蛍光性発色基である。 R_2 のフェニル基又はナフチル基の置換基OZの酵素によって除去可能な基Zは、好ましくはホスフェート基、特に一般式 (III) :

【0036】

【化9】



又は



【0039】(式中、 n は1より大きい) のように接続することができるか、あるいは四級アンモニウム塩重合体、すなわちイオネン重合体の一部にもなりうる。

【0040】別の好ましい酵素によって除去可能な基は、 β -D-ガラクトシド基であり、これは、酵素 β -D-ガラクトシダーゼで開裂してジオキセタンフェノラートの共役酸を生じ、加圧下で化学発光する。

【0041】用い得る酵素によって開裂可能な置換基にはまた、酵素によって開裂しうるアルカノイルオキシ基、例えばアセテートエステル基、酵素によって開裂しうるオキサカルボキシレート基、1-ホスホ-2, 3-ジアシルグリセリド基、1-チオ-D-グルコシド基、アデノシントリホスフェート類基、アデノシンジホスフェート類基、アデノシンモノホスフェート類基、アデノシン類基、 α -D-ガラクトシド基、 β -D-ガラクトシド基、 α -D-グルコシド基、 β -D-グルコシド基、 α -D-マンノシド基、 β -D-マンノシド基、 β -D-フラクトフラノシド基、 β -D-グルコシドウロ

【0037】(式中、 M^+ は例えばナトリウム又はカリウムのようなアルカリ金属のような陽イオン、アンモニウム又は $C_1 - C_7$ アルキル、アラルキル又は芳香族四級アンモニウム陽イオン、 $N(R_1)_4^+$ (各 R_1 はアルキル、例えばメチル又はエチル、アラルキル、例えばベンジルであるか、又は複素環式環系、例えばピリジニウムを形成する) で表されるホスフェートエステル基である。二ナトリウム塩が特に好ましい。そのようなホスフェートエステル基は、アルカリホスファターゼのような酵素を用いて開裂を行うと、酸素アニオンで置換された基を生じ、つまりジオキセタンを不安定化し、その酸素-酸素結合を切断して発光しうる。そのようなホスフェートエステル基の四級アンモニウムカチオンはまた、それらの四級基の1つによって重合体主鎖に、すなわち以下の式 (IV) :

【0038】

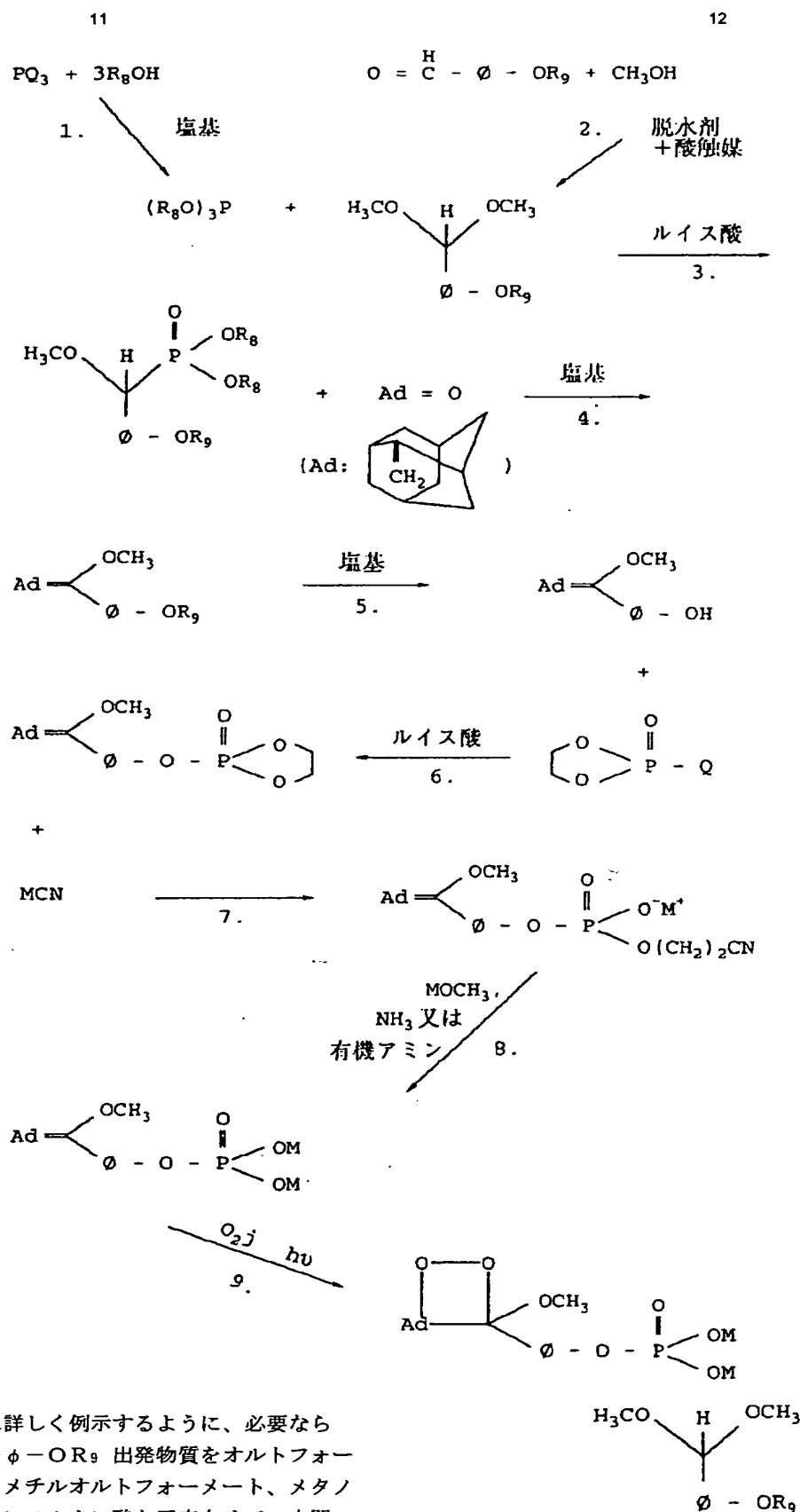
【化10】

ネート基、p-トルエンスルホニル-L-アルギニンエステル基又はp-トルエンスルホニル-L-アルギニンアミド基がある。 R_1 は $-\text{O}(\text{CH}_2)_n\text{CH}_3$ ($n=0 \sim 19$ 、好ましくは $n=0 \sim 5$) である。

【0042】これらの3-(置換アダマント-2'-イリデン) 1, 2-ジオキセタンの全体にわたる合成は、前記ブロンスタイン及びエドワーズの出願並びにエドワーズ等の1989年9月6日付け米国特許出願第279, 176号に記載の方法によって実施することができる。したがって、例えば R_1 がメトキシ基、そして R_2 がホスホリルオキシ基で置換されたフェニル基、好ましくはメターホスホリルオキシ塩で置換されたフェニル基である1, 2-ジオキセタンは、米国特許出願第279, 176号に記載の方法に従って、以下の図に示す反応工程で合成することができる。

【0043】

【化11】



【0044】以下に詳しく例示するように、必要ならば、 $HC(=O) - \phi - OR_9$ 出発物質をオルトフォーメート、例えばトリメチルオルトフォーメート、メタノール及びp-トルエンスルホン酸と反応させて、中間体：

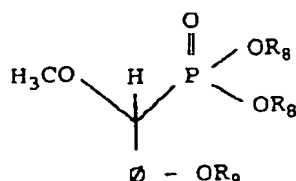
【0045】
【化12】

【0046】を得ることができる。この中間体を $(R_8O)_3P$ 及びルイス酸と反応させると、ホスホネートエス

テル中間体：

【0047】

【化13】



【0048】が得られる。

【0049】上記の反応工程では、R₈は低級アルキル基、例えばメチル、エチル又はブチルである。R₉は炭素原子数2～14のアシル基、例えばアセチル、プロピオニル、メシトイル又はピバロイルであり、Qはハロゲン、例えばクロロもしくはブロモ、又はOR₈であり、そしてMは個々にプロトン、金属陽イオン、例えばNa⁺もしくはK⁺、又はアンモニウム、置換アンモニウム、四級アンモニウム又は(H⁺)ピリジニウム陽イオンである。エドワーズの米国特許出願第213, 197号に記載のチオレート開裂は、R₉が低級アルキル、低級アルケニル又はアラルキル基、例えばメチル、アリル又はベンジルである、上記反応工程5のOR₉の塩基開裂の代わりに用いることができる。塩基又はチオレート開裂の生成物は、R₉の代わりに、水素又はアルカリ金属陽イオン、例えばリチウム、ナトリウム又はカリウムを有する。

【0050】Ad=O

で表される上記の中間体は公知の化合物である。

【0051】メイジャーの学位論文、 Groningen 大学、ザ・ネザーランズ (1982) ; ニューマン等の *J. Org. Chem.*, 43, 2232 (1978) ; 及びフォークナー等の *J. Chem. Soc., Chem. Comm.*, 3906 (1971) には、前記反応工程4及びその後の適当なホスホネート安定化カルバニオンとの反応の出発物質としての4-メチレンアダマンタン-2-オンへ近づく方法が記載されている。エキソメチレン機能の代わりにエノールエーテルに対する一重項酸素の反応性の差によって、3-(4-メトキシスピロ [1, 2-ジオキセタン-3, 2'- (4'-メチレン) トリシクロ [3. 3. 1. 1^{3,7}] -4-イル) フェニル] 二ナトリウムが光酸素付加生成物として確実に得られるようになる。

【0052】選択的開裂が可能なピバロイルオキシアリールエノールエーテルが、ホスフェートエステル基のような酵素によって除去可能な基を付加する直前のいずれかの反応で得られるならば、ヒドロキシアリールエノールエーテルの分離を避けるのがより好都合である。これは、ピバロイルエステルをメタノール中にて1当量のナトリウムメトキシドで直接分離し、そしてナトリウムアリールオキシド成分を反応終了時に全揮発成分を除去することによって乾燥固体として分離することにより行う

ことができる。そのような場合、前記反応工程6はルイス塩基を用いずに、ジメチルホルムアミドのような乾燥極性非プロトン性溶媒中のこの予備形成塩を用いて行い、無機塩副生成物は工程7又は工程8の処理時に除去する。

【0053】工程7の2-シアノエチルホスフェートジエステル生成物は、ベータ脱離して工程8のホスフェートモノエステルにする。工程8では、ジエステル誘導体を、アンモニアのような揮発性アミンと又は“DBU” (1, 8-ジアザビシクロ [5. 4. 0] ウンデセ-7-エン) のような溶媒に可溶性の有機アミンと、メタノールのようなアルコール溶媒中で反応させるのが好ましい。過剰の塩基は真空中、反応終了時点で簡単に揮発させるので、大気圧以上の圧力及び周囲温度でアンモニアを用いるのが特に有利である。

【0054】前記反応工程9のエノールエーテルホスフェートの酸化は、前記のように、ハロゲン化溶媒、例えばクロロホルムのようなハロゲン化炭化水素中での一重項酸素(¹O₂)との反応によって光化学的に行うことができる。上記溶媒はまた補助溶媒、例えばメタノールのような低級アルカノールを含有していてもよい。一重項酸素は、重合体が結合したローズベンガル (ポリサイエンシーズ社)、メチレンブルー又は5, 10, 15, 20-テトラフェニル-21H, 23H-ポルフィン (TPP) のような光増感剤を用いて発生させることができる。

【0055】あるいは、前記反応工程7で得られた粗2-シアノエチルホスフェートジエステルを一重項酸素でそれらの1, 2-ジオキセタンに酸化することもできる。三重項酸素の存在下でのトリエチルシリルヒドロトリオキシド、ホスフェートオゾニド又はトリアリールアミンラジカル陽イオンが介在する、電子酸化を用いた方法を含む、1, 2-ジオキセタンの化学的製法も用いることができる。

【0056】上記のように本発明はまた、化学発光性であり、酵素によって開裂可能な置換1, 2-ジオキセタンを、試料中の酵素を検出するための分析を含めた当業界で公知のアッセイに用いること、そのようなアッセイに用いるキット、及びそれらの使用方法及び手段に関する。

【0057】例えば、本発明を試料中の酵素の検出に用いるとき、試料を、検出する酵素によって開裂可能な基を持つジオキセタンと接触させる。酵素は、ジオキセタンの酵素によって開裂可能な基を開裂して、ジオキセタンに結合した負に荷電した置換基 (例えば、酸素アニオン) を形成する。この負に荷電した置換基は次にジオキセタンを不安定化し、ジオキセタンを分解して、光エネルギーを放出する蛍光発色団基を形成する。酵素の存在を示すものとして検出されるのは、この発色団基である。発光強度を測定することによって、試料中の酵素の

濃度を測定することもできる。

【0058】可視的に検出しうる手段を用いて、試料中の特定の物質の存在又は濃度を測定する、上記とは異なる様々な分析法がある。上記のジオキセタンはこれらのどの分析法にも用いることができる。そのような分析法の例には、抗体又は抗原、例えば δ -又は β -hCGを検出する、免疫学的アッセイ；酵素アッセイ；例えばカリウム又はナトリウムイオンを検出する化学アッセイ；例えばウイルス（例えば、HTLVIII もしくはサイトメガロウイルス）、又はバクテリア（例えば、E. coli）及び特定の細胞機能（例えば、受容体結合部位）を検出する核酸アッセイ等がある。

【0059】検出物質が抗体、抗原又は核酸であるとき、ジオキセタンの酵素によって開裂可能な基を開裂しうる酵素を、検出物質に対して特異的な親和性を有する物質（すなわち、検出物質に特異的に結合する物質）、例えば抗原、抗体又は核酸プローブに結合させるのが好ましい。一般的な方法、例えばカルボジイミドカップリングでは、酵素を特異的に親和性の物質に結合させて用いる；好ましくはアミド結合を通して結合する。

【0060】一般に、分析は次のようにして行う。検出物質を含むと思われる試料を、検出物質に対して特定の親和性を有する物質に結合した酵素を含有する緩衝剤を加えた溶液と接触させる。得られた溶液をインキュベートして、検出物質を特異的な親和性を有する酵素化合物の特異的な親和性部分に結合させる。次に、過剰な、特異的親和性を有する酵素化合物を洗い去り、特異的親和性を有する酵素化合物の酵素部分によって開裂可能な基を有するジオキセタンを加える。酵素は、酵素によって開裂可能な基を開裂して、ジオキセタンを2つのカルボニル化合物（例えば、エステル、ケトン又はアルデヒド）に分解する。酵素によって開裂可能な基が結合した発色団はこれによって励起し、発光する。発光は（例えばキュベット、又はカメラルミノメーターの感光性フィルム、又は光電池又は光電子増倍管を用いて）、試料中の検出物質の存在を示すものとして検出する。発光強度を測定して、物質の濃度を決定する。

【0061】具体的な分析例は以下の通りである。

【0062】A. ヒトIgGのアッセイ

96穴マイクロタイタープレートにヒツジの抗ヒトIgG（F（ab）特異フラグメント）を塗布する。次に、ヒトIgGを含む血清試料を穴に加え、室温で1時間インキュベートする。インキュベーション期間の後、血清試料を穴から取り出し、穴を、0.15M-NaCl、0.01M 磷酸塩及び0.1%ウシ血清アルブミンを含有する水性バッファー溶液（pH7.4）で4回洗浄する。抗ヒトIgGに結合したアルカリホスファターゼを各穴に加え、1時間インキュベートする。次に、穴を上記緩衝液で4回洗浄し、本発明のホスフェート含有ジオキセタンの緩衝液を加える。ジオキセタンの酵素による

分解によって得られる発光を、ルミノメーター、又はカメラルミノメーターの写真フィルムを用いて検出する。

【0063】B. hCGのアッセイ

ウサギの抗 α -hCGをナイロン-メッシュ膜上に吸収させる。hCGを含む試料溶液、例えば妊娠した婦人の尿、を膜を通して吸い取り、その後、膜を0.15M-NaCl、0.01M 磷酸塩及び0.1%ウシ血清アルブミンを含有する緩衝液1ml（pH；7.4）で洗浄する。アルカリホスファターゼ標識抗 β -hCGを膜に加え、膜を再び上記緩衝液2mlで洗浄する。次に、膜をルミノメーターのキュベット又はカメラルミノメーターに入れ、本発明のホスフェート含有ジオキセタンと接触させる。次に、ジオキセタンの酵素による分解から生ずる発光を検出する。

【0064】C. 血清アルカリホスファターゼのアッセイ

0.8Mの2-メチル-2-アミノプロパノールを含有する水性緩衝液2.7mlを12×75mmのパイレックス試験管に入れ、アルカリホスファターゼを含有する血清試料0.1mlを加える。次に、溶液を30℃の平衡状態にする。本発明のホスフェート含有ジオキセタン0.2mlを加え、試験管を直ちにルミノメーターに入れて、生じる発光を記録する。発光レベルはアルカリホスファターゼ活性率に比例する。

【0065】D. 核酸ハイブリダイゼーションアッセイ

サイトメガロウイルスを含むと思われる脳脊髄液（CSF）試料を集め、ナイロン又はニトロセルロース膜のような膜の上に置く。次に、試料を尿素又はグアニジニウムイソチオシアネートで化学処理して、細胞壁を破り、ウイルスDNA以外の全ての細胞成分を分解する。このようにして得たウイルスDNAのストランドを分離し、ニトロセルロースフィルターに結合させる。ウイルスDNAに対して特異的なそしてアルカリホスファターゼで標識したDNAプローブをフィルターに供給し；プローブを相補的ウイルスDNAストランドでハイブリダイズする。ハイブリダイゼーションの後、フィルターを0.2M-NaCl及び0.1mMトリス-HClを含有する水性緩衝液（pH=8.10）で洗浄して、過剰のプローブ分子を除く。本発明のホスフェート含有ジオキセタンを加え、ジオキセタンの酵素による分解から生じる発光をルミノメーターで測定するか、又は写真フィルムで検出する。

【0066】E. ガラクトシダーゼのアッセイ

上記のアッセイ及び以下の実施例において、 α -又は β -ガラクトシダーゼによって開裂可能な α -D-又は β -D-ガラクトシド（ガラクトピラノシド）基をそれぞれ含有するジオキセタンを加えてもよく、発色団からの糖部分の酵素による開裂から生じる発光をルミノメーターで測定するか、又は写真フィルムで検出する。

【0067】F. 電気泳動

電気泳動は、電界中におけるゲル支持体上のタンパク質と核酸の複合体混合物をそれらの分子の大きさ及び構造に従って分離するものである。この方法はまた、タンパク質の加水分解後のタンパク質フラグメントの、あるいは制限エンドヌクレアーゼによる切断後の核酸フラグメントの分離（DNA配列決定におけるような）にも用いられる。ゲル中の成分の電気泳動分解の後、又は分離成分のゲルから膜への移動の後、結合をリガンドに結合した酵素で調べる。例えば、ペプチドフラグメントは、アルカリホスファターゼに共有結合した抗体で調べる。別の例の場合、DNA配列決定において、アルカリホスファターゼ/アビジンをビオチニル化ヌクレオチド塩基に結合する。その後、本発明のAMP PD類似物をゲル又は膜フィルターに加える。短時間インキュベートした後、ジオキセタンが酵素によって活性化されて発光成分が形成された結果、発光が生じる。発光をX線又はインスタント写真フィルムで検出するか、又はルミノメーターで調べる。同時に2つ以上のフラグメントを調べる多重アッセイを用いると、さらに改良される。

【0068】G. 固体状態のアッセイ

固体状態のアッセイでは、非特異的結合部位を、ウシ血清アルブミン（BSA）又はゼラチンのような非特異的タンパク質で予備処理することによって、マトリックスへの非特異的結合をブロックすることが好ましい。BSAの市販製剤には、AMP PDから好ましくないバックグラウンド化学発光を生じるホスファターゼ活性を示す少量の物質を含むものがあることを見出した。しかしながら、特定の水性合成高分子物質がジオキセタンを用いる固体状態のアッセイにおける非特異的結合の十分なブロッカーであることも見出した。そのような物質の中で好ましいのは、水性重合体四級アンモニウム塩、例えばBDMQ、ポリ〔ビニルベンジル（トリメチルアンモニウムクロリド）〕（TMQ）及びポリ〔ビニルベンジル（トリブチルアンモニウムクロリド）〕（TBQ）である。

【0069】H. ヌクレオチダーゼのアッセイ

酵素ATPアーゼのアッセイを2工程で行う。第1工程では、酵素を最適なpH（一般にpH 7.4）で、末端ホスホエステル結合を経て発色団が置換した1, 2-ジオキセタンに共有結合したATPよりなる物質と反応させて、ホスホリル-発色団置換1, 2-ジオキセタンを得る。第2工程では、第1工程の生成物に酸を加えてpHを6未満、好ましくは2~4にすることによって分解し、生じる光をルミノメーターで測定するか、又はクロマトグラフフィルムで検出する。同様な2工程法で、ADPアーゼのアッセイを、基質として本発明の発色団で置換された1, 2-ジオキセタンのADP誘導体を用いて行い、そして5'-ヌクレオチダーゼのアッセイを、基質として本発明の発色団で置換された1, 2-ジオキセタンのアデニル酸誘導体を用いて行う。第2工程はまた、

酵素アルカリホスファターゼを加えて、ホスホリル-発色団で置換された1, 2-ジオキセタンを分解することによって行うことができる。

【0070】I. 核酸配列決定

配列決定法で製造したDNA又はRNAフラグメントは、本発明の化学発光性1, 2-ジオキセタンを用いて電気泳動分離を行った後、検出することができる。DNA配列決定はジデオキシ連鎖停止反応〔サンガー、F. 等、*Proc. Nat. Acad. Sci. (USA)*, 74: 5463 (1977)〕によって行うことができる。簡単に言えば、4つの配列決定反応のそれぞれの場合、一重鎖鋳型DNAをジデオキシヌクレオチド及びビオチニル化プライマーストランドDNAと混合する。アニールの後、クレノウ酵素及びジデオキシアデノシントリホスフェートを4つの配列決定反応混合物それぞれとインキュベートし、追跡デオキシヌクレオチドトリホスフェートを加え、インキュベートを続ける。その後、反応混合物中のDNAフラグメントを、ポリアクリルアミドゲル電気泳動（PAGE）で分離する。フラグメントを膜、好ましくはナイロン膜に移し、そして好ましくは短波長のUV光を照射することによってフラグメントを膜に架橋させる。

【0071】非特異的結合部位を重合体、例えばヘパリン、カゼイン又は血清アルブミンでブロックした後、膜上のDNAフラグメントを、用いる本発明の個々の1, 2-ジオキセタン基質の酵素によって開裂可能な基に特異的な酵素に共有結合した、アビジン又はストレプトアビジンと接触させる。アビジン又はストレプトアビジンはビオチンに食欲に結合するので、ビオチニル化されたDNAフラグメントは酵素で標識される。アビジン又はストレプトアビジンはホスファターゼ又はガラクトシダーゼなどと結合する。DNAフラグメント-ビオチン-アビジン（又はストレプトアビジン）-酵素の複合体を適当な1, 2-ジオキセタンと、アルカリ性のpH値、例えば約pH 8.5で接触させることによって発光させた後、DNAフラグメントを感光性フィルム、例えばX線又はインスタントフィルム上に、あるいは光電ルミノメーター装置で可視化する。

【0072】上に略記した検出法は、チャーチ等〔チャーチ、G. M. 等、*Proc. Nat. Acad. Sci. (USA)*, 81: 1991 (1984)〕のゲノムDNA配列決定法に適用することもできる。化学的に開裂し、電気泳動で分離したDNA〔マキサム、A. M. 等、*Proc. Nat. Acad. Sci. (USA)*, 74: 560 (1977)〕を膜、好ましくはナイロン膜に移し、ラダーをUV光で膜に架橋した後、特異的なDNA配列は、ハイブリダイゼーションプローブとしてのビオチニル化オリゴヌクレオチド；本発明の酵素によって開裂可能な化学発光性1, 2-ジオキセタンに対して特異的な酵素に共有結合したアビジン又はストレプトアビジン；及び適当な1, 2-ジオキセタンを順次加えることによって検出する。（PAGEによって製造された）配

列ラダーのイメージは上記のようにして得られる。

【0073】配列ラダーの連続的リブローピング (reprobing) は、まず、膜を洗浄剤の加熱溶液、例えば約0.5～約5%ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) を約80～約90℃の水に加えたもの、と接触させることによって膜からハイブリダイゼーションプローブ及び化学発光性物質をまずストリップし、約50～約70℃に冷却し、裸のDNAフラグメントを別のピオチニル化オリゴヌクレオチドプローブでハイブリダイゼーションして、異なる配列を得、次に上記のようなイメージ化学発光を生じさせることによって行うことができる。

【0074】同様な検出法を、RNA配列決定法によって生じるRNAフラグメントに適用することができる。

【0075】当業者が本発明をさらに詳しく理解できるように、以下に実施例を示す。これらの実施例は説明のために示したにすぎない。TLC溶媒混合物が容量/容量である以外は、部及びパーセントの全ては断りがなければ重量/容量である。

【0076】実施例I

200g (1.64mol)の3-ヒドロキシベンズアルデヒド及び270ml (1.93mol)のトリエチルアミンを、氷浴中の、塩化メチレン1リッターを含有するフラスコに入れた。得られた褐色の溶液を機械攪拌し、212ml (1.72mol)の塩化トリメチルアセチルを15分間にわたって滴下漏斗から細流状に加えた。得られたスラリーをさらに15分間攪拌し、氷浴を除き、反応をさらに2時間進めた。TLC (K5F; 25%アセトニヘキサン) から、出発物質及び単一の高 R_f 生成物は存在しないことが分かった。反応混合物を分離漏斗に移し、250mlの1M塩酸と混合した。次に、有機相を水 (2×400ml) で抽出し、最後に硫酸ナトリウムで乾燥した。乾燥溶液をシリカゲルプラグに通し、回転蒸発させ、次いで真空中 (1.0mmHg) でポンプしたところ、348gの緑色がかった褐色の油: 3-ピバロイルオキシベンズアルデヒドが得られた。これをアルゴン雰囲気下に置いた。

【0077】実施例II

25mlのメタノールに溶解したp-トルエンスルホン酸400mgを攪拌しながら、実施例Iの3-ピバロイルオキシベンズアルデヒドに加えた。次に、トリメチルオルトフォーメート (224ml; 2.05mol) を滴下した。発熱が少しあるがそのまま進め、混合物を1時間攪拌した。1/2gの炭酸水素ナトリウムを加え、フラスコを回転蒸発器 (浴温40℃) に入れて、揮発性成分を全て除いた。得られた油を窒素圧の下で短いシリカゲルカラムに通して、オレンジ褐色油を得、これを攪拌しながら真空中 (1.0mmHg) で吸引したところ426gの粗3-ピバロイルオキシベンズアルデヒドジメチルアセタールが得られた。赤外アッセイではアルデヒドカルボニルの吸収 (1,695 cm^{-1}) は見られなかった。

【0078】実施例III

実施例IIの粗3-ピバロイルオキシベンズアルデヒドジメチルアセタールを、3リッターのフラスコ中で、アルゴン雰囲気下、 P_2O_5 から新しく蒸留した1リッターの塩化メチレンに溶解した。次に、347ml (2.03mol)のトリエチルホスファイトを全部一度に加えた。フラスコに濾体入りロアダプターを取り付け、少しのアルゴン圧の下でドライアイス/アセトン浴中で冷却した。三フッ化ホウ素エーテル錯化合物 (249ml; 2.03mol) を、激しく攪拌しながら、注射器で数回に分けて加えた。得られた反応混合物を-55℃で2時間攪拌し、次いで-20℃にて一晚フリーザーに貯蔵した。次に、フラスコを室温に温め、その内容物を4時間攪拌した。このオレンジ褐色溶液を、800mlの水に170gの炭酸水素ナトリウムを含む激しく攪拌したスラリーに、激しく泡立つことがないような速度で、注意深く注いだ。2相混合物を1時間激しく攪拌した後、分液漏斗で層を分離し、水性層を再び塩化メチレン (2×250ml) で抽出した。合わせた有機抽出物を硫酸ナトリウムで乾燥し、濃縮し、真空蒸留して、535gのジエチル1-メトキシ-1-(3-ピバロイルオキシフェニル)メタンホスフェートを透明で淡黄色の油 (0.25mmHgで沸点158～161℃) を得た。これは実施例I-IIの全工程に対して91%の収率であった。

^1H NMR (400MHz; CDCl_3): δ 1.21 及び 1.25 (6H, 2つのt, 7Hz, OCH_2CH_3); 3.37 (3H, s, ArCHOCH_3); 3.80 (3H, s, ArOCH_3); 3.9-4.10 (4H, m, OCH_2CH_3); 4.46 (1H, d, 15.6Hz, ArCHPO); 6.85 (1H, m); 7.00 (2H, m); 7.26 (1H, m)。

IR (ニート): 2974, 1596, 1582, 1480, 1255 (P=O), 1098, 1050, 1020, 965 cm^{-1} 。

【0079】実施例IV

さらに以下に挙げた促進重合体の存在下で、本発明の化合物によって得られる化学発光が (AMP PDからの発光と比べて) 増加することを、下記の方法で証明した。1mM塩化マグネシウム、0.02%アジ化ナトリウム及び0.1%の促進剤重合体を含有する0.1M ジエタノールアミン (pH10.0、基質用バッファー) 中に、比較する4種の1,2-ジオキセタンのうちの1種の0.4mM水溶液450 μl をそれぞれ含む3本の管を4組準備し、各管からのバックグラウンドシグナルを、ベルソールドLB 952トルミノメーター (ベルソールド・インスツルメンツ; ドイツ連邦共和国、ワイルドバッド) を用いて測定した。1mM塩化マグネシウム、0.02%アジ化ナトリウムを含有する0.1M ジエタノールアミン (pH10.0) に2.83 $\times 10^{-12}$ Mのアルカリホスファターゼを含む水溶液50 μl (最終酵素濃度2.83 $\times 10^{-13}$ M) を各管に加え、化学発光シグナルを5及び20分においてルミノメーターで測定した。

【0080】用いた促進重合体は下記の通りである:

記号	促進重合体
SAPPHIRE	BDMQ
TMQ	ポリ〔ビニルベンジル（トリメチルアンモニウムクロリド）〕
S/TMQ	スチレン/TMQ 共重合体
DAA/TMQ	ジアセトンアクリルアミド/TMQ 共重合体
DMQ/TEQ	ポリ〔ビニルベンジル（ドデシルジメチルアンモニウムクロリド）〕/TEQ 共重合体
TEQ	ポリ〔ビニルベンジル（トリエチルアンモニウムクロリド）〕
TBQ	ポリ〔ビニルベンジル（トリブチルアンモニウムクロリド）〕
MPB	ポリ〔ビニルベンジル（N-メチルピペリジニウムクロリド）〕
BAEDM	ポリ〔ビニルベンジル（（2-ベンゾイルアミノエチル）ジメチルアンモニウムクロリド）〕
BZ	ベンザル媒染剤
DMEB	ポリ〔ビニルベンジル（ジメチルエチルアンモニウムクロリド）〕
DME(OH)B	ポリ〔ビニルベンジル（ジメチル（2-ヒドロキシエチル）アンモニウムクロリド）〕
EMERALD	サファイア及びフルオレセイン
TBQ/FLUOR	TBQ 及びフルオレセイン

【0081】以上、主に本発明の好ましい具体例及び実施例について述べた。当業者であれば、請求の範囲に記

載の本発明の精神及び範囲から逸脱することなく、本発明を変更することは容易に行うことができる。

フロントページの続き

(51) Int. Cl. ⁶

識別記号

F I

C 1 2 Q 1/68

C 1 2 Q 1/68

A

G 0 1 N 33/533

G 0 1 N 33/533

(72)発明者 エドワーズ, ブルックス
アメリカ合衆国マサチューセッツ州02138,
ケンブリッジ, ヒューロン・アベニュー
269

(72)発明者 ジュオ, ローロン
アメリカ合衆国マサチューセッツ州02134,
オーストン, ホルマン・ストリート 28